



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Estudio del eje FOXO3a-FOXO1 en líneas celulares de glioma

Iván Pérez Núñez

Grau de Biología

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 45406445H

Treball tutelat per Silvia Fernández de Mattos
Departament de Biología Fundamental

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línea, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:
Glioblastoma multiforme, FoxM1, FoxO3a, Thioestrepton, Trifluoperazina, U87, LN299

Índice

1. Resumen	4
2. Introducción	5
2.1. Glioma	5
2.1.1. Glioblastoma multiforme.....	6
2.2. Factor de transcripción FoxM1	7
2.2.1. Funciones de FoxM1	7
2.2.1.1. Proliferación y ciclo celular.....	8
2.2.1.2. Senescencia celular.....	8
2.2.1.3. Homeostasis de los tejidos.....	8
2.2.1.4. Crecimiento celular.....	8
2.2.1.5. Angiogénesis.....	8
2.2.1.6. Migración e invasión.....	9
2.2.1.7. Resistencia a drogas.....	9
2.3. Factor de transcripción FoxO3a	9
2.3.1. Proliferación y apoptosis.....	10
2.3.2. Resistencia al estrés celular.....	10
2.3.3. Eje FoxM1-FoxO3a.....	10
2.4. Agentes tiazolados	11
2.5. Trifluoperaziana y FoxO3a	11
3. Material y métodos	12
3.1. Mantenimiento celular.....	12
3.2. Ensayo de viabilidad.....	13
3.3. Análisis de combinación.....	13
3.4. Determinación actividad caspasa.....	14
3.5. Análisis estadístico.....	15
4. Objetivos y diseño experimental	15
5. Resultados	16
5.1. Ensayo de viabilidad.....	16
5.2. Análisis de la combinación de fármacos.....	19
5.3. Análisis de la actividad caspasa.....	21
6. Discusión	22
7. Conclusión	23
8. Agradecimientos	24
9. Bibliografía	

RESUMEN

El glioblastoma multiforme (GMB) es un tipo de tumor del Sistema Nervioso Central que se origina por una proliferación en astrocitos (astrocitoma), considerándose es el tipo de astrocitoma más severo (grado 4). FoxM1 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes relacionados con vías de señalización que conducen a un crecimiento celular (progresión del ciclo), división celular, proliferación, angiogénesis y supervivencia celular. Se ha comprobado que FoxM1 puede encontrarse sobreexpresado en muchos tipos de tumores, incluido GMB. Por otro lado, otro gen importante en la regulación del ciclo celular es FoxO3a. Este factor de transcripción regula procesos como proliferación, apoptosis, metabolismo y longevidad. La regulación de FoxO3a depende de Akt, proteína que fosforila a FoxO3a e inhibe su actividad transcripcional. En este estudio, se trabaja con Thiostrepton (agente tiazolado), el cual inhibe FoxM1, y con Trifluoperazina, fármaco que activa FoxO3a. El estudio se ha realizado en dos líneas celulares de GMB: U87 MG y LN229. Se han realizado ensayos de viabilidad en ambas líneas con los dos fármacos para obtener la IC₅₀ de ambas líneas, se ha comprobado si Thiostrepton (TS) puede tener efecto sinérgico con la quimioterapia convencional de GBM (Temozolamida) mediante ensayos de viabilidad y, por último, se ha analizado la actividad caspasa de ambas líneas después del tratamiento con Thiostrepton, Temozolamida y la combinación de ambos.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GMB) is one the most severe cancers of the Central Nervous System and the most severe type of astrocytome (4th grade). FoxM1 is a transcription factor which regulates genes directly related with proliferation and cell survival. Overexpression of FoxM1 is a common feature of different types of cancer such as GMB. FoxO3a is another important gene for cell regulation. Apoptosis is one of the most important events regulated by FoxO3a. FoxO3a is downregulated by the PI3K pathway via Akt-dependent phosphorylation. In this work, we wanted to analyse the effect of two drugs, Thiostrepton which is a thiazole agent and FoxM1 inhibitor, and trifluoperazine which is a FoxO3a activator, in two GMB cell lines: U87 MG and LN229. Viability assays have been conducted in both cell lines with Thiostrepton and Trifluoperazine to obtain the IC₅₀. Furthermore, we have analysed the synergistic effect of Thiostrepton together with the conventional chemotherapeutic agent temozolamide (TMZ) by viability essays. Finally, we have analyzed the caspase activity at different concentrations of Thiostrepton, Temozolamide and the combination.

2. Introducción

El cáncer es una enfermedad en la que las células, por algún motivo, desregulan el ciclo y proliferan sin control. Además, estas células tienen el riesgo añadido de poder invadir otros tejidos y diseminarse a través del sistema sanguíneo.

La desregulación del ciclo es causada por mutaciones en genes que alteran vías de señalización y hacen que la célula adquiera un carácter anormal. Una célula normal está regulada por estas vías de señalización, de manera que cuando entra en apoptosis, se expresarán ciertos genes, y cuando se divide, se expresarán otros. Si en estas vías de señalización hay un defecto, como puede ser un gen mutado, pueden ser alteradas haciendo que la célula se divida sin control.

En este trabajo se hablará de un tipo de cáncer concreto, el glioma. Más concretamente se ha trabajado en células de glioblastoma multiforme, que es el tipo de glioma más severo. El trabajo se centrará en dos proteínas muy particulares que tienen un papel en la regulación del ciclo: FoxM1 y FoxO3a. Además se hablará de la acción de dos compuestos químicos que actúan directamente sobre estos dos genes: el Thiostrepton (TS) y la Trifluoperazina (TFP).

2.1 Glioma

El primer caso de glioma al que se puede acceder data de 1870, cuando Charles M. Allin recibió un paciente el cual acudió al médico por un ojo inflamado. Después de analizarlo detalladamente, se dieron cuenta de que debajo de la retina, había células que empujaban a ésta hacia delante (Allin, C.M 1870). Ya entonces recibió el nombre de sarcoglioma. Se siguieron dando casos de gliomas intra-oculares en 1870 y 1873. En 1874 se dio la primera conferencia clínica sobre este tipo de tumor (Smith, R. S. 1874). Con el paso de los años y los avances tanto en biología celular como molecular, se han detallado muchos aspectos celulares y moleculares que ocurren en los gliomas.

Un glioma es un tumor del sistema nervioso central producido por una desregulación del ciclo celular en células de la glía (Liu, M. et al 2006). Este tipo de tumores aún no tienen un tratamiento específico y efectivo debido a su difícil acceso, ya que el fármaco utilizado tiene que atravesar la barrera hematoencefálica (Ware, M.S., Berger, M. S., & Binder, D. K., 2003).

Hoy en día ya son fácilmente reconocibles y se tiene una clasificación detallada (Kleihues, P. et al. 2002) de los tipos de tumores del sistema nervioso central:

<i>Tabla 1. Clasificación de los gliomas según la OMS.</i>			
	Astrocitoma	Oligodendroma	Oligo-astrocitoma
Grado I	Astrocitoma Pilocítico		
Grado II	Astrocitoma	Oligodendroma	Oligo-astrocitoma
Grado III	Astrocitoma Anaplástico	Oligodendroma Anaplástico	Oligo-astrocitoma Anaplástico
Grado IV	Glioblastoma Multiforme		

Tabla 1. Muestra los tipos de gliomas y su grado de severidad (Kleihues, P et al. 2002)

Según la clasificación de la OMS, los Astrocitomas se pueden diferenciar según su grado de malignidad del I al IV. El Astrocitoma Pilocítico (Grado I) es el menos maligno y suele ocurrir en edades tempranas. Rara vez suele progresar hacia Astrocitomas más severos. Por otro lado, pacientes con Astrocitoma (Grado II) o con Astrocitoma Anaplástico (Grado III) suelen progresar hacia Glioblastoma Multiforme (Grado IV), el cual es el glioma más peligroso (Liu, M. et al 2006).

El glioma es uno de los cánceres más mortíferos que se conoce. Los pacientes diagnosticados con glioma tienen un rango de vida de unos 5 años (Siegel, R. et al 2014).

2.1.1 Glioblastoma Multiforme

El Glioblastoma Multiforme (GMB) es el más estudiado de todos los gliomas y es el más peligroso, siendo su media de supervivencia de 9 a 12 meses desde su diagnóstico.

En los últimos años se han identificado genes cuya expresión está asociada directamente con el GBM. En particular, se han identificado genes cuya expresión juega un papel fundamental en el desarrollo del glioma. Uno de estos genes que se ha visto que puede tener un papel importante es FoxM1, cuya expresión se ha visto que aumenta dependiendo del grado del glioma, siendo significativamente superior en GBM comparado con un astrocitoma de grado medio (Grado II) (van den Boom, J. et al 2003).

Prácticamente podemos distinguir dos tipos de GBM: los primarios y los secundarios. Los primarios son aquellos que surgen de novo mientras que los secundarios son aquellos que resultan de la evolución de otro astrocitoma de menor grado, normalmente astrocitoma medio o astrocitoma anaplástico. Como generalidad, los GBM primarios son los más comunes de todos y suelen presentar deleciones de la lípido fosfatasa PTEN, mientras que los secundarios suelen ser por una mutación del supresor tumoral *p53* (Jovčevska, I. et. al 2013). No obstante, otras vías como la EGFR, PDGF/PDGFR y Akt se encuentran alteradas en GMB (Dai, B. et al 2010)

Por otro lado, otro gen que se está estudiando hoy día en GMB es FoxO3a. FoxO3a es un promotor muy importante de apoptosis. Uno de los efectos que se está estudiando hoy en día es la relación de FoxO3a con FoxM1 ya que puede inhibirlo. A su vez, FoxO3a está directamente fosforilada por proteína quinasa B (Akt), por lo que la activación de Akt es crítica para la regulación de FoxO3a (Nho, R. et. al. 2014).

2.2 Factor de transcripción FoxM1

Esta proteína, antes denominada como HH-11, WIN, MPP2 y Trident (Korver, W. et al 1997), es un miembro de la familia de factores de transcripción “Forkhead box”, cuya función es regular el ciclo celular. En tejido fetal suele estar sobreexpresado, mientras que en células ya diferenciadas su nivel de expresión se ve muy disminuido (Liu M. et al 2006).

Cabe destacar que FoxM1 tiene preferencia por la secuencia consenso “TAAACA”. Su expresión va directamente relacionada con la proliferación celular.

El gen FoxM1 contiene 10 exones y se encuentra en la región del cromosoma 12p13-3 (Korver, W. et al 1997). De estos 10 exones, el exón Va y el exón VIIa se unen por “splicing alternativo”, dando lugar a 3 variantes (Yao, K. et al. 1997):

- FoxM1a: contiene tanto el exón Va y VIIa. Puede inhibir al resto de isoformas, pero su actividad transcripcional está inhibida.
- FoxM1b: es la más abundante de las tres isoformas. No contiene ninguno de los dos exones comentados anteriormente. Es transcripcionalmente activo.
- FoxM1c: solo contiene el exón Va. También es transcripcionalmente activo.

2.2.1 Funciones de FoxM1

FoxM1 tiene funciones totalmente relacionadas con el mantenimiento celular. En concreto, sus funciones son: respuesta al daño al DNA, progresión del ciclo celular, crecimiento celular y supervivencia, angiogénesis, resistencia a fármacos, migración e invasión.

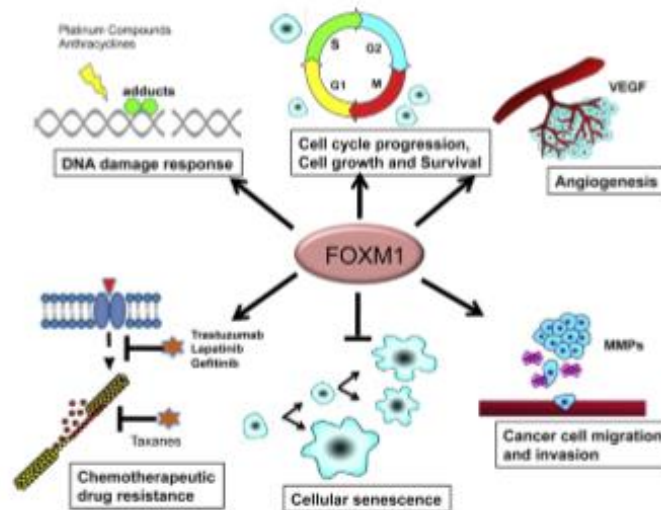


Imagen 1. Se muestra un resumen de las funciones que tiene FoxM1 (extraída Yoo, C.Y et. al. 2012.)

2.2.1.1. Proliferación y ciclo celular

FoxM1 tiene un papel en la progresión del ciclo celular y en la proliferación. Es un gen clave en las transiciones de G1-S y G2-M, además de estar relacionado con la progresión de la mitosis. Controla la transcripción de Sk2 y Cks1, proteínas que son

clave para la ubiquitinización y degradación de los inhibidores de quinasas ciclina-dependientes (p21 y p27). Además, regula otros genes tales como Cdc25B, ciclina B, y otras relacionadas con la transición de G2-M, estabilidad cromosómica y segregación durante la mitosis. En células con FoxM1 deficiente se ve un descenso de Cdc25C y un incremento nuclear de p27^{Kip1}, lo cual evidencia que FoxM1 coopera con otros reguladores del ciclo celular y oncogenes promotores de la proliferación (Koo, C.Y. et al. 2012).

2.2.1.2. Senescencia celular

La senescencia celular la podemos definir como un estado celular en la cual la célula inhibe su proliferación en respuesta al estrés. Diversos estudios sugieren que FoxM1 también contribuye a la transformación celular actuando como un antagonista de la senescencia. Se ha comprobado en ratones que sus fibroblastos, en ausencia de FoxM1, llegan a la senescencia prematuramente. La expresión de FOXM1 suprime el estrés oxidativo inducido por la senescencia celular y la acumulación de marcadores de senescencia, como p53 y p21^{Waf1/Cip1} y p19^{Arf} (Li, S. et al 2008). FoxM1 induce a la expresión del grupo de proteínas Bmi-1 vía el oncogen c-myc (Li, S. et al 2008).

2.2.1.3. Homeostasis de tejidos

FoxM1 también juega un papel importante en embriones y órganos en desarrollo como tejidos en regeneración. Como se dijo antes, FOXM1 es expresado en tejidos fetales durante la embriogénesis tales como tejido epitelial y tejidos con orígenes mesenquimales (Ye, H. et al 1997). No obstante, no es usual encontrar FOXM1 en células diferenciadas, aunque su actividad puede reactivarse en tejidos en recuperación, como se ha demostrado en estudios de pulmón, hígado y páncreas (Koo, C.Y et al 2012).

2.2.1.4. Angiogénesis

La angiogénesis es uno de los pasos clave en la progresión de un cáncer. Es el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos necesarios para el crecimiento del tumor. Muy relacionado con este proceso está el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este factor es el principal activador de la angiogénesis. FOXM1 regula directamente la angiogénesis activando la expresión de VEGF, uniéndose directamente con los "Forkhead binding elements" (FHRE) del promotor del VEGF (Zhang, Y. et al 2008).

2.2.1.5. Migración e invasión

La degradación de la membrana basal y varios componentes de la matriz extracelular (ECM) está facilitada por la acción de endopeptidasas zinc-dependientes, denominadas metaloproteínas (MMPs). De esta familia, MMP-2 y MMP-9 están implicadas en la invasión tumoral. Se ha demostrado que una reducción de FoxM1 reduce los niveles de MMP-2 y MMP-9 en cáncer de páncreas, resultando en un descenso de la migración celular, invasión y angiogénesis (Wang, Z. et al 2009; Overall, C.M. et al 2006; van Kempen, L.C. et al 2002). Este mismo efecto se ha descrito para otros cánceres como el carcinoma y glioblastoma (Koo, C.Y. et al 2012).

2.2.1.6. Resistencia a drogas

La función citotóxica de la terapia convencional del cáncer puede ser inespecífica, lo que puede dañar células que están sanas. Es por esto que hoy en día se trabaja para fabricar drogas que tengan dianas específicas. No obstante, es poco conocido los mecanismos por los que estos fármacos realizan su acción en el ciclo celular. Recientes investigaciones demuestran que FOXM1 juega un papel fundamental en la sensibilidad celular a ciertas drogas. Niveles altos de FOXM1 activan o expresan algunos mecanismos de resistencia a fármacos.

2.3 Factor de transcripción FoxO3a

Este factor de transcripción también pertenece a la familia de proteínas Fox y es de la clase O. Los factores de transcripción FOXO juegan un rol conservado en el control del metabolismo, proliferación, supervivencia, resistencia y longevidad (Accili, D., Arden, KC 2004).

FoxO es una familia de factores de transcripción altamente conservados con 110 aminoácidos que se unen al DNA, denominados “Forkhead Box O”. Dentro de esta subfamilia FoxO encontramos 4 miembros: FoxO1, FoxO3a, FoxO4 y FoxO6. De estos 4 miembros, FoxO1 y FoxO3 son los más estudiados. Recientes estudios han mostrado que FoxO3a contiene residuos de hélice H3 (NXXRHXXS/T). Sus dianas de transcripción son aquellos genes que tienen una secuencia consenso 5'-GTAAA(T/C)AA-3' y 5'-(C/A)(A/C)AAA(C/T)AA-3', conocido como secuencia TRE (Nho, RS, Hergert, P. 2014).

Su expresión es muy importante para inducir a la célula a apoptosis o arresto del ciclo celular en muchos tipos celulares. El miembro de la familia FoxO más estudiado en glioblastoma es FoxO3a. FoxO3a es una diana de la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt, de manera que cuando se activa, FoxO3a es directamente fosforilada por Akt (Van Der Heide, LP et al 2004), a través de los residuos T32, S253 y S315 (Nho, RS, Hergert, P. 2014). Una vez fosforilada, FoxO3a se transloca al citoplasma y es sujeto de ubiquitización y degradación por el proteosoma (Nho, RS, Hergert, P. 2014). Cuando se encuentra desfosforilada, se transloca al núcleo donde se une al DNA y promueve la transcripción de genes como p27^{kip1} y Bim (Nho, RS, Hergert, P. 2014). Por tanto, la activación de Akt es un importante regulador negativo de FoxO3a. La lipídofosfatasa PTEN es un importante regulador negativo de la vía PI3K/AKT que se encuentra mutada en ciertos GMB.

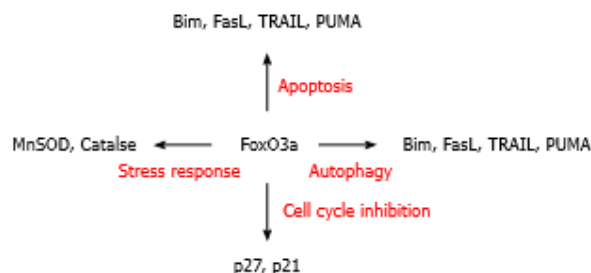


Imagen 2. Se muestra un resumen de la actividad transcripcional de FoxO3a (Extraída de Nho, RS, Hergert, P. 2014)

2.3.1 Proliferación y apoptosis

La activación de FoxO3a incrementa inhibidores del ciclo como p21 y p27, lo cual suprime el paso de G1 a S. La proteína p27^{kip1} puede unirse a miembros del complejo ciclina-CDK, que es el complejo regulador del paso de G1 a S en el ciclo celular. Se ha demostrado que p27 se encuentra reducido en cáncer humano, incluyendo GMB. Por ello, los niveles de esta proteína pueden ser asociados con el desarrollo de cánceres humanos (Shi, J. et al 2010). Esta proteína es transcrita por la acción de FoxO3a, de manera que su disminución da lugar a un aumento de ciclo celular (Shi, J. et al 2010).

Otros genes que se ven afectados por los niveles de FoxO3a nucleares son TRAIL, Bim, PUMA y el ligando Fas, los cuales son promotores de la apoptosis (Shi, J. et al 2010).

2.3.2 Resistencia al estrés

FoxO3a no solo tiene efectos a nivel de ciclo celular, sino que está activado en respuesta a estrés en condiciones desfavorables. Se ha visto que en presencia de especies reactivas del oxígeno (ROS), se produce una activación de FoxO3a para proteger la célula. En *Caenorhabditis elegans*, se regulan hasta 230 genes que están involucrados en la respuesta al estrés (Shi, J. et al 2010).

2.3.3 Eje FoxM1-FoxO3a

El trabajo se centra en el eje de FoxM1 y FoxO3a. FoxM1 es diana de FoxO3a, de manera que se produce una regulación negativa. A su vez, la activación de otros factores de transcripción de la subfamilia FOXO produce una regulación positiva de FoxO3a. Un factor muy relacionado es FoxO1, de manera que la acción de FoxO1 va relacionada con FoxO3a y viceversa.

En este trabajo se pretende estudiar si la alteración de la función de FoxM1 o FoxO3a puede producir un descenso de la viabilidad celular. En teoría, una inhibición de FoxM1 produciría la inhibición de genes proliferativos, mientras que una activación de FoxO3a produciría un aumento de la expresión de genes pro-apoptóticos y una regulación negativa de FoxM1.

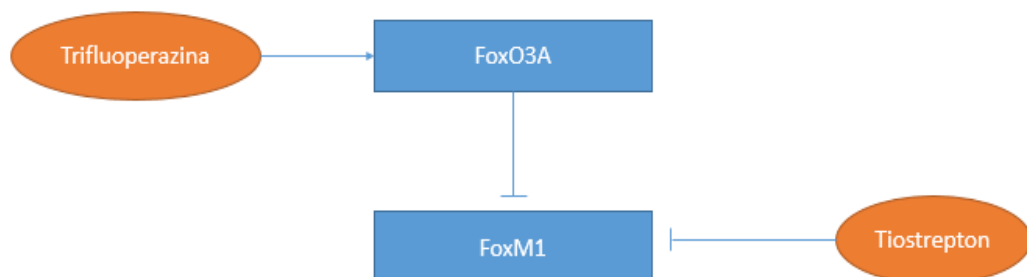


Imagen 3. Se muestran las relaciones entre FoxO3a y FoxM1.

2.4. Agentes tiazolados

Se ha demostrado que los fármacos tiazoles son una terapia muy prometedora contra el cáncer mediante la supresión de FoxM1. El primer fármaco tiazolado descubierto fue el tiopeptido Siomicina A, el cual es un potente inhibidor de FoxM1. Otro agente tiazolado descubierto recientemente es el Thiostrepton, el cual ha sido aprobado por la FDA para el uso en animales. La diferencia entre la Siomicina A y el Thiostrepton radica en 2 residuos (Bhat, U. G., Halasi, M., & Gartel, A. L. 2009).

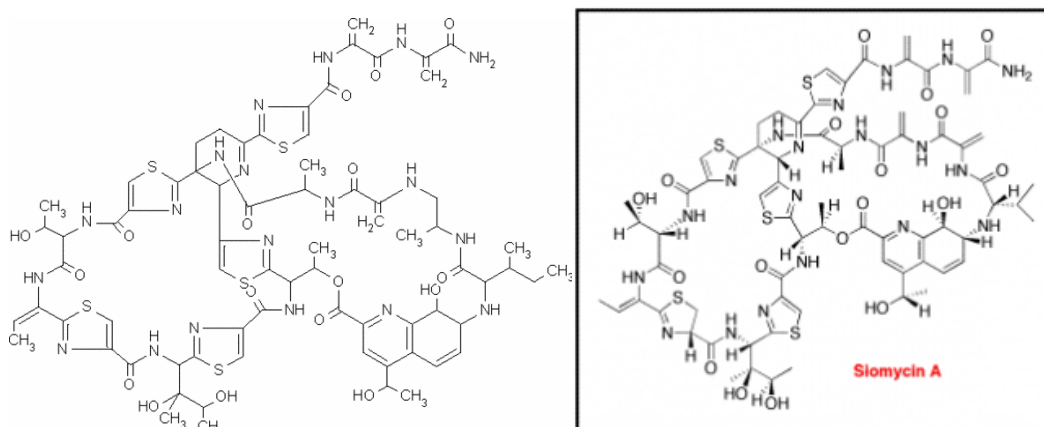


Imagen 3 y 4. Estructura de la Siomicina A y Thiostrepton obtenida de Sigma-Aldrich®

Estos fármacos eran utilizados en un principio como antibióticos ya que, en procariontes, interactúan con la subunidad 23S del ribosoma e impiden la síntesis de proteínas. No obstante, esto no sucede en eucariotas (Lentzen G, Klinck R, Matassova N, Aboul-ela F, Murchie AI, 2003). Es importante saber, como hemos dicho antes, que estos antibióticos no solo inhiben la actividad FoxM1, sino que también inhibe su expresión, lo cual puede sugerir que FoxM1 actúa como factor de transcripción para su propia expresión (Halasi M, Gartel AL, 2009).

Por otro lado, se ha comprobado que estos antibióticos no afectan a la expresión de otras “Forkhead Family” como FoxA1, **FoxO3a** o FoxO1. Esto sugiere que tanto el Thiostrepton como la Siomicina A tienen como diana específica FoxM1 (Bhat, U. G., Halasi, M., & Gartel, A. L. 2009).

2.5. Trifluoperazina y FoxO3a

Como se ha comentado en apartados anteriores, FoxO3a es un factor de transcripción que regula procesos apoptóticos. Este factor de transcripción es inactivado por AKT mediante fosforilación. El fármaco Trifluoperazina puede inhibir la exportación de FoxO3a del núcleo al citosol y así evitar su degradación por el sistema ubiquitín-proteosoma (Sangodkar, Jaya, et al. 2012).

La Trifluoperazina es un antagonista del receptor de dopamina, de la familia de las pentotiazinas. Es inhibidor de las calmodulín quinasa y evita la exportación al citosol de factores de transcripción de la familia FoxO. Estudios demuestran que la calmodulina es un regulador de la localización de los factores de transcripción de la familia FoxO. Reduciendo la concentración de calcio o inactivando la calmodulina

puede conducir a una inactivación de Akt, lo cual evitaría la fosforilación de FoxO3a (Kau, Tweeny R., et al 2003).

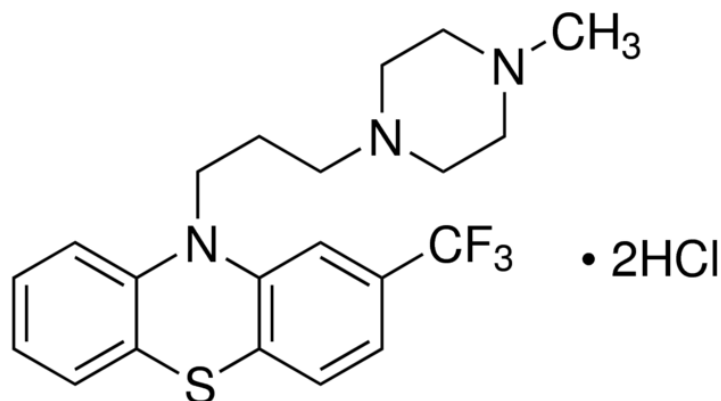


Imagen 5. Estructura de la Trifluoperazina dihidroclorada obtenida de Sigma-aldrich®

3. Material y métodos

Este trabajo tiene como fin observar el eje FoxO3a-FoxM1 y su relación con GMB. Dichos genes son una prometedora diana en estudio para la elaboración de nuevos fármacos antitumorales. Esto se debe a que cada vez más, se van entendiendo los mecanismos moleculares y celulares por los cuales una célula puede transformarse en maligna, y estos dos factores de transcripción parece ser que tienen una gran importancia en dicha transformación tal y como se ha detallado anteriormente.

Podemos diferenciar cuatro métodos en este trabajo: un mantenimiento celular, la obtención de curvas dosis-respuesta a fármacos relacionados con FoxO3a-FoxM1, estudios sinérgicos o de combinación entre Thiostrepton, el cual es uno de los fármacos utilizados que inhibe FoxM1, y la terapia convencional del cáncer con Temozolamida, y el análisis de la actividad caspasa. Cada una de estas partes se detallará de aquí en adelante.

3.1 Mantenimiento celular

En toda la investigación se han utilizado dos líneas celulares de glioblastoma caracterizadas cada una por presentar mutaciones en distintos genes. Por un lado, se ha utilizado la línea U87 MG, caracterizada por presentar deleciones en la lipofosfatasa PTEN (Haas-Kogan, Daphne, et al, 1998). Por otro lado, la segunda línea utilizada ha sido LN229, la cual se caracteriza por tener p53 mutado (Albertoni, Michele, et al. 2002). Ambas líneas celulares han sido suministradas por el Doctor Joan Secane (Instituto de Oncología Vall d'Hebron, Barcelona).

Las líneas celulares han sido cultivadas en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino inactivado (FBSi) junto con los antibióticos penicilina y estreptomina para evitar contaminaciones (Madrid, España, Sigma-Aldrich®). Todo el trabajo que ha requerido condiciones de esterilidad (mantenimiento, ensayos de viabilidad y sinérgias) se han realizado en una campana de bioseguridad II. Las placas con cultivos celulares han sido mantenidas en un incubador a 37°C a 5% de CO₂.

En cuanto al diseño para el resto de experimentos, siempre se ha tenido una placa p60 como mantenimiento de las líneas, y diversas placas p100 dependiendo del experimento a realizar. Para pasar células de una placa a otra, primero se recoge el medio con un aspirador. Como segundo paso, se añade PBS fosfato para limpiar los restos de medio, que pueden inhibir la actividad de la tripsina. Se recoge el PBS y se añade tripsina que tiene actividad peptidasa y degrada las proteínas que mantienen adheridas a las células en la placa. Por último, se añade medio para inhibir la tripsina y se pasan células a una nueva placa. Tanto la tripsina como el PBS han sido obtenidos de Sigma-Aldrich®.

3.2 Ensayos de viabilidad celular

En los ensayos de viabilidad se pretende dar curvas dosis-respuesta de cada línea celular a dos compuestos químicos. También se pretende dar la IC₅₀ de estos fármacos, que es la dosis a la cual tenemos el 50% del efecto del fármaco. Dicha IC₅₀ será importante para la fijación de las condiciones de experimentos posteriores. Los compuestos utilizados son Thiostrepton, inhibidor de FoxM1, y Trifluoperazina, activador de FoxO3a. Dichos fármacos proceden de Sigma-Aldrich®.

La primera parte de un ensayo de viabilidad, es cuantificar la concentración de células por mililitro con una cámara de Neubauer. Con esta concentración de células, se obtiene el volumen que se necesita de cada placa para inyectar 5000 células por cada pozo en una placa de 96 pocillos. En esta placa de 96 pocillos se realizarán los distintos tratamientos a distintas concentraciones.

Para el ensayo de viabilidad se ha utilizado el kit *CellTiter-Glo® Luminiscent Cell Viability Assay Kit* (Madison, WI, Promega). Este método se ha realizado siguiendo las instrucciones del fabricante, añadiendo 50 µL de reactivo a cada pocillo con 50 µL de DMEM. Con éste método, el objetivo es cuantificar la cantidad total de ATP en el medio. Al añadir el reactivo se produce una lisis celular, de manera que el ATP queda libre en el medio. El reactivo, a su vez, contiene una luciferasa que dependiendo de la concentración liberada de ATP, emitirá luz de manera proporcional (Crouch SP et al 1993). Por lo tanto, cuantas más células haya, mayor cantidad de ATP presente en el medio y por tanto mayor cantidad de luz.

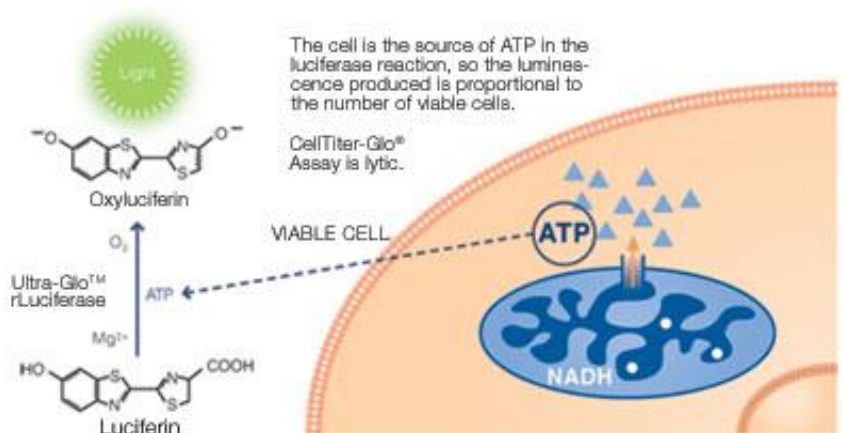


Imagen 6. Muestra la reacción de la Luciferasa en presencia de ATP. Imagen obtenida de Promega,

Por último, para cuantificar la luminiscencia producida, se utilizó un *Synergy MX Microplate Reader* (Biotek). Este sistema es capaz de cuantificar, entre otras cosas, la luminiscencia emitida.

Con los datos obtenidos, se puede saber el porcentaje de viabilidad celular para cada concentración. De las tres replicas por concentración, se obtiene la media de luminiscencia. Dicha media de luminiscencia se compara respecto al control, de manera que obtenemos un porcentaje de viabilidad. También se obtuvo la IC₅₀ exacta gracias al software GraphPad Prism.

3.3 Análisis de combinación

El objetivo de estos análisis es comprobar si la adición de una de las drogas estudiadas al tratamiento estándar de quimioterapia mejora el efecto. En este caso, la Temozolamida (TMZ) a distintas concentraciones ha sido combinada con Thioestrepton (1 μ M, dosis consensuada a partir de los ensayos de viabilidad anterior).

En cuanto a la metodología, es igual a la utilizada para los ensayos de viabilidad, solo que en este caso, en vez de tener Thioestrepton y Trifluoperazina a distintas concentraciones, se ha utilizado Temozolamida a distintas concentraciones y Thioestrepton combinado con las mismas concentraciones anteriores de TMZ. Las concentraciones usadas han sido 25, 50, 100 y 250 μ M de TMZ y 1 μ M de Thioestrepton.

Para detectar la viabilidad celular se utilizó el mismo kit comercial que en el caso de las viabilidades con Thioestrepton y Trifluoperazina.

Una vez obtenidas las gráficas de dosis-respuesta, se procedió a analizar la actividad sinérgica de los fármacos con el software GraphPad Prism, con el cual se obtuvo un isoblograma mediante el método de Chou-Talalay (Chou TC, Talalay P, 1984).

3.4 Análisis de la actividad Caspasa

El objetivo de dicho análisis es analizar la actividad caspasa tras el tratamiento con Thioestrepton y Temozolamida, y la combinación de ambas.

Dicho ensayo es muy parecido a los ensayos de viabilidad celular. En una placa de 96 pocillos se siembran 4500 células por pozo. Después, las células se tratan con Thioestrepton, Temozolamida o la combinación de ambas. Cabe destacar que los ensayos se han realizado a 24 horas de tratamiento. Las concentraciones utilizadas han sido 1 μ M y 2.5 μ M de Thioestrepton, 100 μ M de Temozolamida y la combinación de Temozolamida con las dos concentraciones de Thioestrepton.

Para el análisis de la actividad caspasa se ha utilizado el kit comercial *Caspase-Glo 3/7 Assay*[®], proveniente de Promega. Este kit comercial consta de un reactivo el cual contiene un tetrapéptido llamado DEVD. Este reactivo es capaz de lisar las células. Una vez lisadas, el contenido celular se libera al medio. Las caspasas 3 y 7 son capaces de romper la molécula DEVD, de manera que el sustrato final interacciona con una luciferasa. Dicha luciferasa emite luz de manera proporcional a la cantidad de caspasa

en el medio. Esta luz fue medida usando el equipo *Synergy MX Microplate Reader*. El reactivo se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante y añadiendo 25 μl de reactivo y 25 μl de medio DMEM.

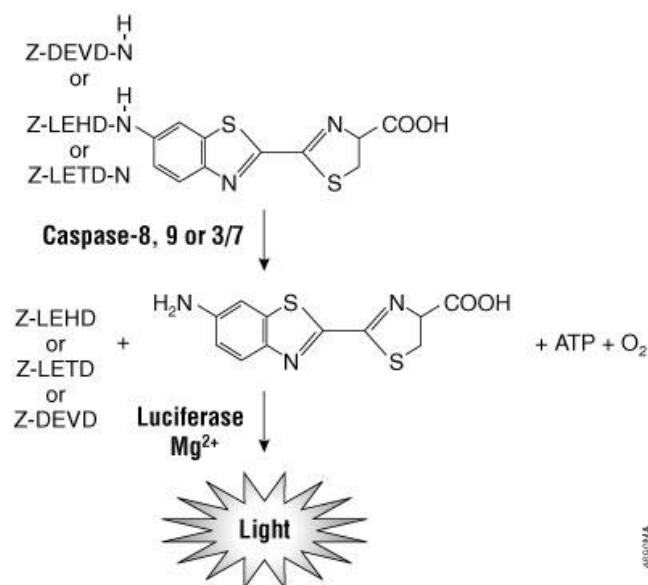


Imagen 7. Muestra la reacción del tetrapéptido DEVD al interactuar con las caspasas. Imagen obtenida de Promega,

3.5 Análisis estadístico

Se han realizado los pertinentes análisis estadísticos para comprobar que los resultados son estadísticamente significativos. Para realizar los test estadísticos se ha utilizado la interfaz de R.

4 Objetivos y diseño experimental

El objetivo fundamental del presente trabajo es comprobar si la activación de FoxO3a o la inactivación de FoxM1 producen una disminución en la viabilidad celular. Por otro lado, otro objetivo del trabajo es comprobar si la combinación de Thiostrepton con la terapia convencional para el Glioblastoma produce un efecto sinérgico o aditivo. Por último, se quiere comprobar cómo afecta dicha combinación de fármacos a la actividad caspasa. Para cada experimento, se ha necesitado como mínimo una placa p100 de cada una de las líneas celulares. Siempre se ha calculado el número de placas necesarias para realizar los experimentos la semana anterior. Para el mantenimiento de cada línea se ha cultivado una placa p60 de cada una de las líneas.

En cuanto a las viabilidades celulares, cada una de las réplicas fue realizada en experimentos de tres días:

- En el primer día, se trata de contar células de las placas a fin de obtener células/mL. El conteo de células se realiza en cámaras de Neubauer. A continuación se calculan los μL necesarios para sembrar 5000 células por pozo. Una vez se sabe el volumen necesario se inoculan células en los pozos necesarios.

- El segundo día es de tratamiento de las células. Primero hay que realizar las diluciones pertinentes de las drogas de interés. Una vez se tienen las diluciones pertinentes, se aspira el medio de cada pozo y se inoculan 100 μL de cada tratamiento en los correspondientes pocillos. En los pozos de la primera columna se inocula medio. En los siguientes pozos de las columnas sucesivas se inocula primero un tratamiento, de menor a mayor orden de concentración; y después el otro tratamiento de la misma manera.
- El último día, una vez transcurridas 48 horas, se lee la placa de 96 pozos.

Por otro lado, para realizar las sinergias, se siguió exactamente el mismo mecanismo que antes para las viabilidades y el mismo diseño experimental, salvo las diferencias anteriormente comentadas en material y métodos.

Por último, para los ensayos de actividad caspasa se ha seguido un diseño experimental muy similar a las viabilidades celulares y se ha dividido el experimento en 3 días:

- El primer día se contaron células a fin de sembrar 4500 células por cada pozo. Por cada experimento (n), se utilizaron 24 pozos, distribuidos en 4 filas y 6 columnas. En las dos primeras filas se sembraron U87MG mientras que en las dos siguientes se sembraron LN229.
- En el segundo día se trataron las células. En la primera columna solo se administró medio (control). En la segunda fila y tercera fila se administró Thioestrepton. En la cuarta columna se administró Temozolamida. Por último, en las dos últimas se administró la combinación.
- En el último día se leyeron las placas. Para ello, primero se recogió el tratamiento y después se añadieron las cantidades de medio DMEM y reactivo ya mencionado en material y métodos. Se dejó 30 minutos de incubación y después se procedió a analizar la luminiscencia.

5. Resultados

5.1 Viabilidades celulares

El objetivo de las viabilidades es comprobar si inhibiendo FoxM1 o activando FoxO3a se reduce la viabilidad de las líneas celulares de Glioblastoma. Para inhibir FoxM1, fue utilizado Thioestrepton, tal y como se ha detallado en la introducción, mientras que para activar FoxO3a se utilizó Trifluoperazina. Los detalles prácticos han sido detallados en Material y métodos; y el diseño experimental. Las concentraciones usadas para Thioestrepton en cada línea celular fueron 1, 2, 5 y 10 μM ; mientras que para Trifluoperazina fueron utilizadas las concentraciones 5, 10, 12.5, 15 y 20 μM . Los resultados obtenidos son los siguientes:

La IC50 se obtuvo mediante el Software Graphpad Prism. Los resultados obtenidos son los siguientes:

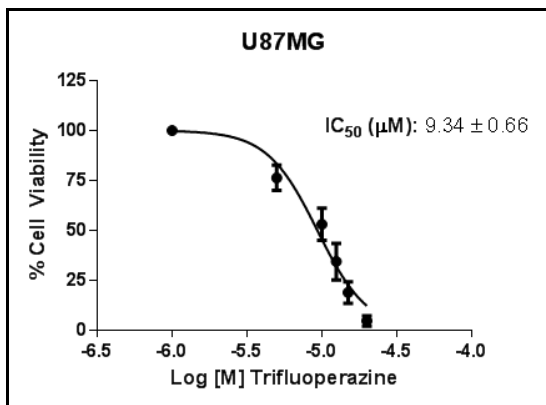
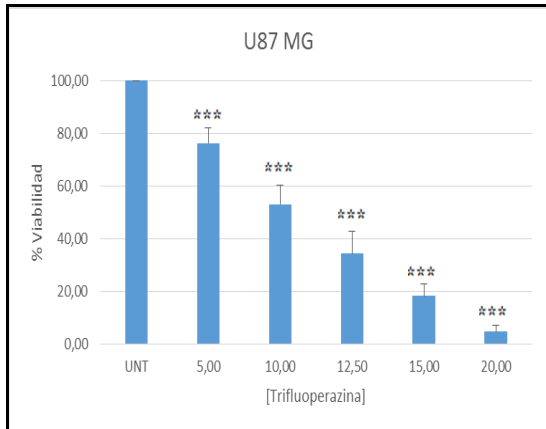
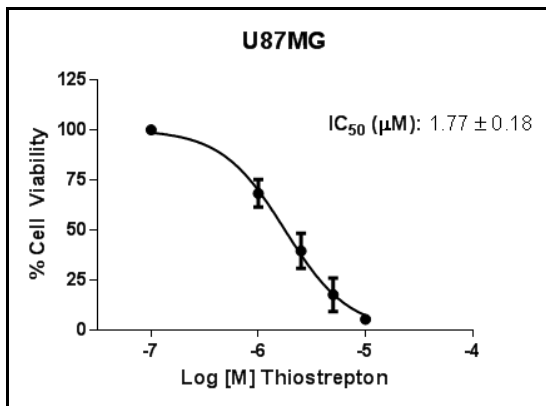
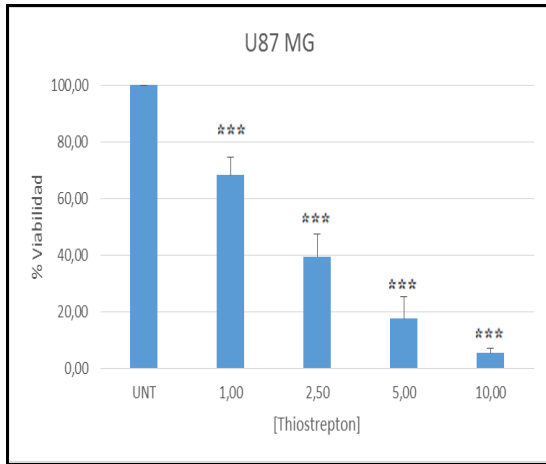


Figura 1.A

Se muestran los resultados de viabilidad celular de U87MG tratadas a diferentes concentraciones de Thiostrepton y Trifluoperazina. El número de réplicas fue de 6. Los resultados muestran diferencias extremadamente significativas en cada caso mediante test post-hoc (Bonferroni), con un p-valor de 1.284e-05 en el caso de Thiostrepton y de 3.41e-06 en el caso de la Trifluoperazina obtenidos mediante ANOVA.

Bajo cada gráfica se puede apreciar la curva obtenida mediante Graphpad Prism. Este programa normaliza logaritmicamente los resultados obtenidos y obtiene la curva. Mediante esta curva se puede calcular la IC₅₀. Se dan las curvas obtenidas y la IC₅₀ en U87MG de los dos fármacos estudiados.

Se puede apreciar que tanto Thiostrepton como Trifluoperazina disminuyen la viabilidad celular de las células U87MG.

La IC₅₀, que es la concentración a la que tenemos el 50% de efecto de la droga, es 9.34 µM en el caso de Trifluoperazina, y 1.77 µM en el caso de Thiostrepton, siendo esta segunda droga bastante más efectiva en cuanto a la disminución de la viabilidad celular.

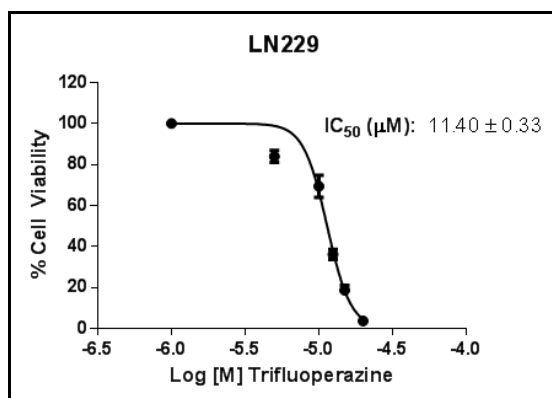
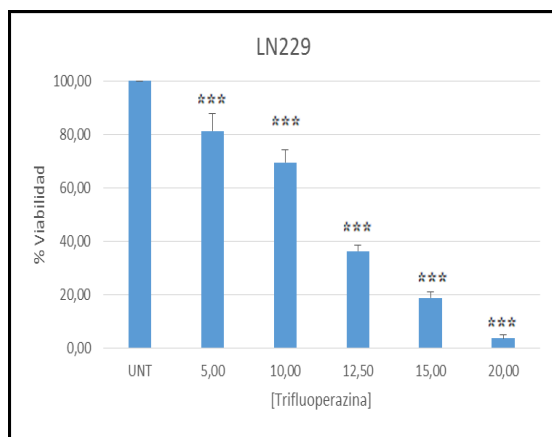
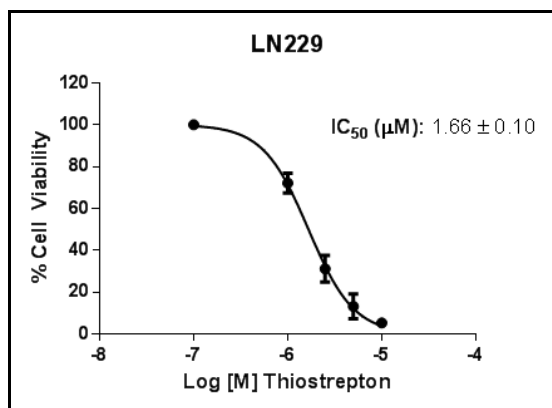
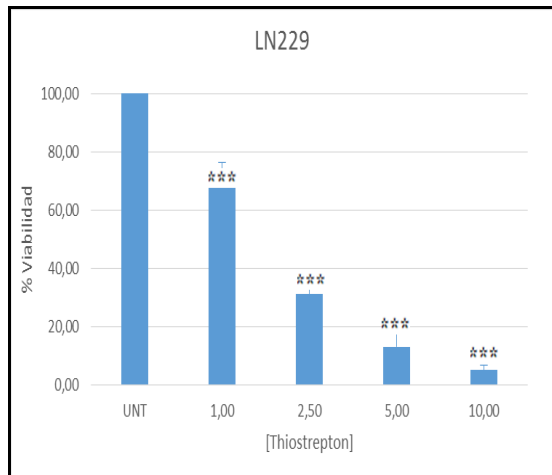


Figura 1.B

Se muestran los resultados obtenidos de las viabilidades realizadas en LN229 tratadas a diferentes concentraciones de Thiostrepton y Trifluoperazina. El número de réplicas fue de 6. Los resultados muestran diferencias extremadamente significativas en cada caso mediante test post-hoc (Bonferroni), con un p-valor de $1.461e-05$ en el caso de Thiostrepton y de $2.583e-06$ en el caso de la Trifluoperazina obtenidos mediante ANOVA.

Bajo cada gráfica se puede apreciar la curva normalizada obtenida mediante Graphpad Prism. También se puede apreciar la IC_{50} obtenidas en la línea LN229 para Thiostrepton y Trifluoperazina.

Al igual que se puede apreciar en la línea celular U87MG, tanto Thiostrepton como Trifluoperazina disminuyen la viabilidad celular en la línea LN229, siendo sus IC_{50} semejantes.

Lo que se puede apreciar es que la línea LN229 es ligeramente más resistente a la Trifluoperazina, siendo la IC_{50} en este caso de $11.40 \mu M$.

5.2 Análisis de combinación

La Temozolamida es la terapia convencional de GMB y, como bien es sabido, causa daños no solo en el tumor, sino que presenta efectos secundarios. Cabe destacar que su principal función es daño en el DNA (Newlands, E. S et al 1997).

Con este ensayo de combinación se pretende comprobar si la Temozolamida y el Thiostrepton son compuestos sinérgicos, de manera que con bajas concentraciones de ambos se consiga el mismo o un efecto superior al tratamiento con concentraciones altas de los fármacos por separado.

También se ha obtenido las gráficas dosis-respuesta de la Temozolamida para ambas líneas celulares.

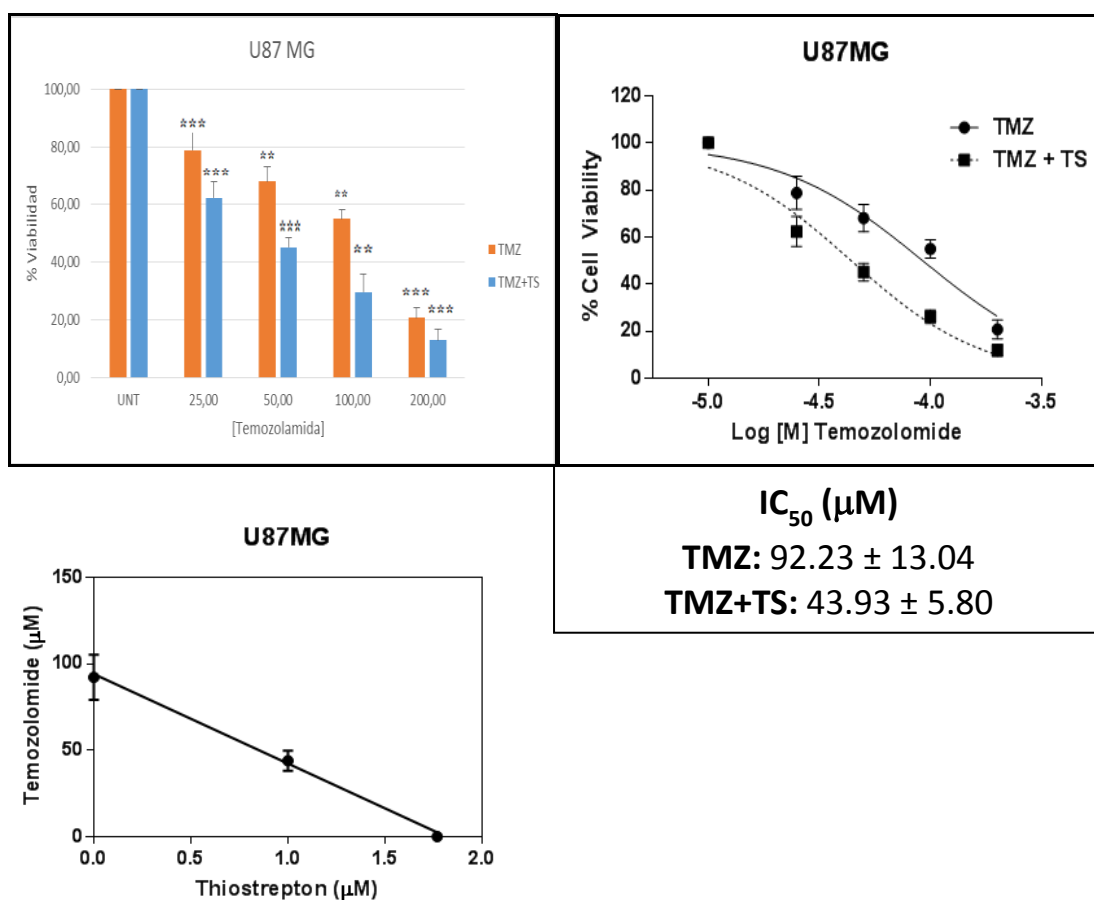
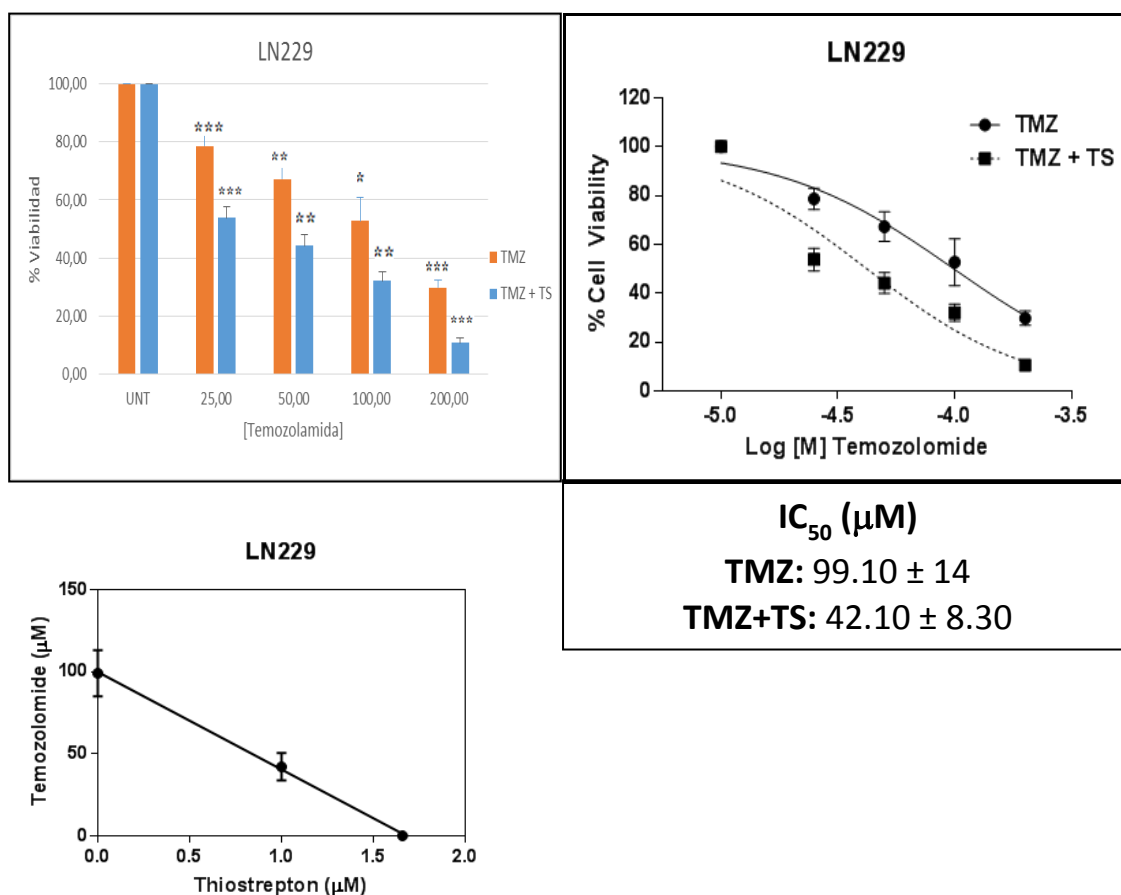


Figura 2.A

Se muestran los resultados de viabilidad obtenidos tanto para Temozolamida como para la combinación con Thiostrepton (gráfica de la izquierda) de la línea U87MG. También se muestra la curva normalizada por logaritmos mediante el programa GraphPad Prism (gráfica de la derecha). Por último, se muestra el Isoblograma obtenido mediante el mismo software. También se muestran las IC₅₀ obtenidas de la Temozolamida y la combinación

En cuanto a las viabilidades, los resultados muestran diferencias significativas con un p-valor de 0.001222 para la Temozolamida y 0.001019 para la combinación según el análisis ANOVA. Los test post-hoc muestran resultados estadísticamente significativos. El número de réplicas fue n=4.

**Figura 2.B**

Se muestran los resultados de viabilidad obtenidos tanto para Temozolamida como para la combinación con Thiostrepton (gráfica de la izquierda) de la línea LN229. También se muestra la curva normalizada por logaritmos mediante el programa GraphPad Prism (gráfica de la derecha). Por último, se muestra el Isoblograma obtenido mediante el mismo software. También se muestran las IC₅₀ obtenidas de la Temozolamida y la combinación

En cuanto a las viabilidades, los resultados muestran diferencias significativas con un p-valor de 0.001222 para la Temozolamida y 0.001019 para la combinación según el análisis ANOVA. Los resultados post-hoc muestran resultados estadísticamente significativos. El número de réplicas fue n=4.

Se puede observar que tanto para las U87 como para las LN229, la viabilidad celular baja considerablemente si a las distintas dosis de Temozolamida se le añade Thiostrepton 1 µM. Esto queda claramente en evidencia si nos fijamos en las IC₅₀ tanto de U87MG como de LN229 obtenidas mediante el Graphpad Prism. Estas IC₅₀ se reducen aproximadamente a la mitad en ambos casos en presencia de Thiostrepton.

Al realizar el análisis de Chou-Talalay mediante el GraphPad, el resultado obtenido es que los dos fármacos tienen un efecto aditivo. Dicho análisis se basa en la unión de las IC₅₀ de cada fármaco por una recta. La concentración de Temozolamida se sitúa en el eje Y y la concentración de Thiostrepton en el eje X. Sus IC₅₀ quedan unidas

por una recta. Luego se extrae la concentración IC_{50} de la combinación y dicho punto queda representado en la gráfica. Si el punto queda por debajo de la recta que une las IC_{50} , los fármacos se consideran sinérgicos, mientras que si queda por encima se considera que los fármacos no interactúan entre sí, o bien incluso que son antagónicos. Si el punto cae justo en la recta, entonces se considera que los fármacos tienen efecto aditivo.

En nuestro caso, en ambas líneas celulares, Thiostrepton y Temozolamida tienen efecto aditivo.

5.3 Análisis de la actividad Caspasa

La vía de las caspasas es la vía clásica de muerte por apoptosis. Con este ensayo se pretende analizar si los fármacos utilizados en la combinación activan la vía de las caspasas en un rango de tiempo rápido (24 horas). A continuación, se muestran los resultados obtenidos en las dos líneas celulares tratadas con Thiostrepton, Temozolamida y en combinación:

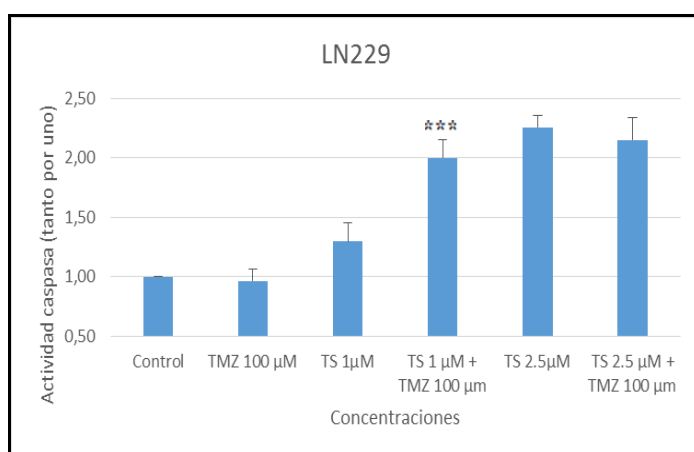
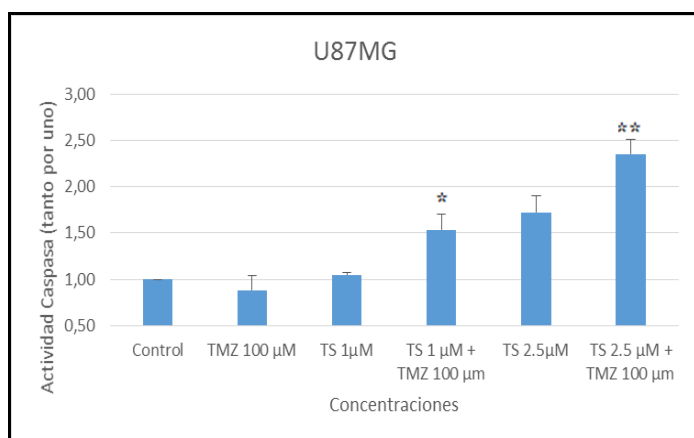


Figura 3.

Se muestran los resultados de la actividad caspasa con distintos tratamientos en la línea U87MG y LN229. El número de réplicas realizadas fue de $n=3$ en cada línea. Los resultados en la línea U87MG muestran diferencias significativas con un p-valor 0.00921 según el análisis de ANOVA. Los resultados Post-hoc muestran diferencias significativas entre el tratamiento con Thiostrepton a concentración 1 μM y la combinación de Thiostrepton (a la misma concentración) y Temozolamida 100 μM ; y entre el tratamiento con Thiostrepton a 2.5 μM y la combinación (a la misma concentración de Thiostrepton). Los resultados en la línea LN229 muestran diferencias significativas con un p-valor de 0.009723 según el análisis de ANOVA. Los resultados Post-hoc muestran diferencias significativas entre el Thiostrepton 1 μM y el Thiostrepton (a la misma concentración) con Temozolamida 100 μM .

Se puede apreciar como la actividad caspasa no incrementa significativamente tras el tratamiento con Temozolamida a una concentración alta ni con Thiostrepton a 1 μM en las dos líneas celulares. No obstante, la combinación de ambas drogas aumenta la actividad caspasa.

En la línea U87MG se ve un claro aumento de la actividad caspasa a concentraciones más altas de Thiostrepton en combinación con Temozolamida respecto a las drogas por separado, mientras que en la línea LN229 no se aprecia este incremento.

6. Discusión

Estudios recientes han demostrado que FoxM1, el cual es un factor de transcripción con papel proliferativo, se encuentra sobreexpresado en un alto porcentaje de GMBs (Liu, M et al 2006). Por otro lado FoxO3a es un factor de transcripción con papel pro-apoptótico que es translocado al citoplasma por fosforilación mediante la vía Akt. Una de las funciones importantes de FoxO3a es que inhibe a FoxM1. En este estudio se ha estudiado si la activación de FoxO3a o la inhibición de FoxM1 pueden reducir la viabilidad celular en dos líneas celulares de GMB. También se ha estudiado el efecto combinatorio de Thiostrepton con la Temozolamida, a fin de ver si es posible reducir la dosis de Temozolamida en presencia de Thiostrepton manteniendo o superando el efecto de los fármacos por separado, de manera que se podrían evitar o reducir los efectos secundarios.

Como se dijo en la introducción, Thiostrepton es un fuerte inhibidor de FoxM1 (Halasi M, Gartel AL, 2009), mientras que Trifluoperazina es un fármaco activador de FoxO3a (Sangodkar, Jaya, et al. 2012). FoxM1 es un factor de transcripción implicado en vías proliferativas, así como en la regulación de proteínas de estabilidad cromosómica. Al inhibir FoxM1, se producen fallos durante la mitosis por la inactivación de expresión de proteínas implicadas en la segregación cromosómicas (Li, Y., Zhang, S., & Huang, S. 2012). Por otro lado, FoxO3a, tal y como se detalla en la introducción, es una proteína implicada en la apoptosis, por lo que es de esperar que con su activación, la viabilidad celular disminuya. Como se puede apreciar en el apartado de resultados, tanto la inactivación de FoxM1 por parte de Thiostrepton como la activación de FoxO3a por parte de la Trifluoperazina inducen un descenso de la viabilidad celular en ambas líneas celulares. Se ha obtenido la IC_{50} de ambos fármacos en ambas líneas celulares, siendo el resultado cercano a 1 μM en Thiostrepton y 10 μM en Trifluoperazina. Si nos fijamos más concretamente en cada línea, las IC_{50} para el Thiostrepton se encuentran muy cercanas, siendo 1.77 μM para U87MG y 1.66 para LN229. No obstante, las IC_{50} para la Trifluoperazina varían ligeramente entre las dos líneas, siendo sus valores 9.34 μM en U87MG y 11.40 μM en LN229, por lo que esta línea celular es más resistente a la activación de FoxO3a. En cualquier caso, ambas drogas disminuyen la viabilidad celular in vitro en diferentes líneas celulares.

Por otro lado, el análisis de combinación ha demostrado como la Temozolamida, la cual es una droga con efectos secundarios y de efecto lento, cuya IC_{50} calculada a 48 horas es cercana a 100 μM en cada línea celular, en presencia de Thiostrepton a 1 μM ve reducida a la mitad su IC_{50} . Realizando el análisis combinatorio, el resultado final es que se produce un efecto aditivo entre los dos fármacos. Esto quiere decir que, en pacientes más sensibles a la Temozolamida se podría reducir la dosis de tratamiento a la mitad añadiendo Thiostrepton a dicha concentración. Por el contrario, en pacientes más resistentes a esta droga o en pacientes cuyo tumor es muy agresivo, se podría utilizar la misma concentración de Temozolamida y, si además se le añade Thiostrepton, cabe esperar que tenga un mayor efecto sobre el tumor. No obstante, más estudios de combinación a diferentes concentraciones de Thiostrepton son necesarios para determinar un posible rango de concentración que tenga un efecto sinérgico. En

cualquier caso, los resultados obtenidos son muy prometedores y se requiere de un estudio más a fondo tanto molecular como celular de la combinación.

La última parte del trabajo realizado es el análisis de la actividad caspasa. Las caspasas son un grupo de proteasas muy conocido y cuya vía es el principal mecanismo de muerte celular por apoptosis. Lo que se quiere ver con este ensayo es si ambas drogas por separado inducen la actividad caspasa y si la combinación de ambas drogas potencia esta inducción. Como se puede apreciar, el Thioestrepton a bajas concentraciones (1 μM) no induce la actividad caspasa después de 24 horas de tratamiento. No obstante, a concentraciones superiores (2.5 μM) si se observa una actividad caspasa relativamente alta. Por otro lado, la Temozolamida ha resultado ser una droga de efecto muy lento, ya que a 24 horas no ha aumentado la actividad caspasa. Estos resultados encajan con otros resultados obtenidos por el grupo de investigación, los cuales demuestran que pasadas 72 horas no se ve un aumento de caspasas en diferentes líneas por parte de la Temozolamida (resultados no mostrados). Por otra parte, resulta interesante el hecho de que la combinación entre Thioestrepton (1 μM) y Temozolamida (100 μM) aumentan significativamente la actividad caspasa en ambas líneas celulares respecto a ambas drogas por separado. Este hecho encaja con los resultados de los análisis de combinación, ya que éstos demuestran una mayor efectividad en ambas líneas celulares. Por otro lado, a concentraciones más altas de Thioestrepton (2.5 μM) junto con Temozolamida (100 μM) han resultado tener un aumento de caspasas significativamente más alto que las drogas por separado solo en la línea U87MG, mientras que en LN229 no se ha dado. Esto puede deberse a que la combinación de ambos fármacos es tan potente que pasadas 24 horas quedan un número reducido de células, y por tanto la actividad caspasa, aunque corregida por la viabilidad, puede no ser un resultado fiable.

Por último, cabe destacar que hubiese sido interesante la obtención de resultados en la determinación proteica mediante Western Blot para ver la expresión de ciertas proteínas para poder así entender molecularmente mejor la acción del Thioestrepton y la Trifluoperazina, así como poder establecer un mejor conocimiento entre el eje FoxO3a-FoxM1. Dichos Westerns se realizaron, pero por problemas técnicos no se obtuvieron resultados concluyentes (no mostrados). Cabría esperar que con el tratamiento de Trifluoperazina FoxO3a hubiese aumentado su expresión o disminuido su fosforilación. A su vez, al activar la Trifluoperazina, también es de esperar que disminuyan los niveles de FoxM1 y con ello todas las vías que éste activa. Por otro lado, con Thioestrepton, hubiese sido de esperar que los niveles de FoxM1 bajaran rápidamente y con ello todas las vías que éste activa. La duda estriba en saber que hubiese sucedido con los niveles de FoxO3a, aunque otros estudios afirman que el Thioestrepton no afecta a los niveles de otros factores de transcripción de la familia "Forkhead" (Bhat, U. G., Halasi, M., & Gartel, A. L. 2009). Si bien se necesitan estudios más exhaustivos, el grupo de investigación ha obtenido resultados que pueden resultar contradictorios con estudios anteriores, ya que han visto un aumento de los niveles de FoxO3a (resultados no mostrados). En definitiva, hubiese sido satisfactorio para el entendimiento molecular que los resultados hubiesen acompañado en la investigación realizada, pero no ha sido el caso.

7. Conclusiones

1. Tanto la inhibición de FoxM1 con Thiostrepton como la activación de FoxO3a con Trifluoperazina disminuyen la viabilidad celular en líneas celulares de GBM.

Además, dichas drogas actúan a bajas concentraciones. Por lo tanto, el eje FoxM1-FoxO3a juega un papel muy importante en la tumorigénesis y su alteración por distintas drogas puede ser una prometedora terapia en un futuro.

2. La combinación de Thiostrepton y Temozolamida presenta un efecto aditivo.

La Temozolamida es una droga alquilante usada a día de hoy como terapia convencional del GMB. No obstante, esta droga puede conducir a efectos secundarios en los pacientes. El hecho de que Thiostrepton incremente el efecto de la Temozolamida en combinación es un dato importante para el tratamiento de pacientes sensibles a la Temozolamida. A dichos pacientes se les podría aplicar la mitad de dosis de Temozolamida en combinación con Thiostrepton haciendo el mismo efecto y reduciendo así los efectos secundarios. También se podría mirar por el lado contrario y, pacientes más resistentes a la Temozolamida, se les podría aplicar la misma dosis de Temozolamida en combinación con Thiostrepton aumentando así la eficiencia. Como conclusión, el Thiostrepton es una droga prometedora que tiene un efecto aditivo con la Temozolamida a concentración de 1 μM , aunque más estudios de combinación son necesarios para establecer un mecanismo de acción de dicha combinación.

3. La actividad caspasa es activada por Thiostrepton a las 24 horas de tratamiento, mientras que no sucede lo mismo con Temozolamida. La combinación de Thiostrepton y Temozolamida potencia la activación de las caspasas.

Hemos comprobado como la Temozolamida a la dosis de 100 μM no producen actividad caspasa después de 24 horas, mientras que el Thiostrepton sí puede inducir dicha actividad a concentraciones superiores a 1 μM después de 24 horas. Así, la Temozolamida es una droga de acción lenta, que tarda más de 24 horas en activar la vía de las caspasas. Por otro lado, la inhibición de FoxM1 por parte de Thiostrepton sí que aumenta la actividad caspasas después de 24 horas a 2 μM , lo cual sugiere que FoxM1 juega un papel central en la proliferación y supervivencia celular, de manera que ésta disminuye rápidamente cuando FoxM1 es inhibido. Finalmente, la combinación de Temozolamida y Thiostrepton produce un aumento de la actividad caspasa respecto a la actividad que produce el Thiostrepton por sí solo, lo cual está correlacionado con los resultados vistos en el análisis de combinación. Esto último puede sugerir que las dos drogas en combinación pueden tener un mecanismo de acción distinto a las dos drogas por separado. .

8. Agradecimientos

Me gustaría agradecer el apoyo y la ayuda en este trabajo a diversas personas. En primer lugar, me gustaría agradecer a Silvia Fernández de Mattos el haberme seleccionado aun siendo un trabajo no expuesto inicialmente para alumnos de biología, además de asesorarme durante mi trayectoria en el laboratorio. También agradecer a Priam De Villalonga Smith que, aun sin ser mi tutor, tuviera siempre tiempo para responder algunas preguntas, además de su ayuda para la elaboración de las figuras de este trabajo. Por otro lado, me gustaría un fuerte agradecimiento a Rut Villalonga Planells, Guillem Ramis Munar y a Margalida Serra Sitjar, compañeros de laboratorio

que siempre han tenido un segundo para responder cualquiera de mis preguntas, además de enseñarme con detalle las técnicas básicas tanto de cultivos como del laboratorio. Ellos me han explicado cada una de las técnicas aun teniendo que realizar su trabajo y nunca han rehusado responderme cualquier cosa. Me gustaría también agradecer a mi compañero de TFG Fernando Unzueta Payeras, compañero de bioquímica que siempre ha estado dispuesto a echarme una mano como “pasándome” alguna placa con células, elaborando geles para Westerns (aunque luego no salieran bien los resultados) y un largo etc. Por último, me gustaría agradecer el trabajo a Sofía Tejada Magraner, persona externa al trabajo en sí, pero que me ha tenido que aguantar en mis momentos de estrés máximo (sobre todo en julio). Sin su apoyo, se me hubiera hecho muy cuesta arriba.

Bibliografía

Accili, D., & Arden, K. C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, *117*(4), 421-426

Albertoni, M., Shaw, P. H., Nozaki, M., Godard, S., Tenan, M., Hamou, M. F.,... & Hegi, M. E. (2002). Anoxia induces macrophage inhibitory cytokine-1 (MIC-1) in glioblastoma cells independently of p53 and HIF-1. *Oncogene*, *21* (27), 4212-4219.

Allin, C. M. (1870). A Case of Supposed Glioma. Occurring in the Clinic of Dr., at the New York Eye and Ear Infirmary: Erskine Mason. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, *1*(7), 70

Anderson, D. J., & Blobel, G. (1983). [8] Immunoprecipitation of proteins from cell-free translations. *Methods in enzymology*, *96*, 111-120.

Bhat, U. G., Halasi, M., & Gartel, A. L. (2009). Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS One*, *4*(5), e5592.

Chan, D. W., Yu, S. Y. M., Chiu, P. M., Yao, K. M., Liu, V. W. S., Cheung, A. N. Y., & Ngan, H. Y. S. (2008). Over-expression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis. *The Journal of pathology*, *215*(3), 245-252.

Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation*, *22*, 27-55.

Crouch, S. P. M., Kozlowski, R., Slater, K. J., & Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *Journal of immunological methods*, *160*(1), 81-88.

Dai, B., Pieper, R. O., Li, D., Wei, P., Liu, M., Woo, S. Y.,... & Huang, S. (2010). FoxM1B regulates NEDD4-1 expression, leading to cellular transformation and full malignant phenotype in immortalized human astrocytes. *Cancer research*, *70*(7), 2951-2961.

Haas-Kogan, D., Shalev, N., Wong, M., Mills, G., Yount, G., & Stokoe, D. (1998). Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Current Biology*, *8*(21), 1195-S1.

Halasi, M., & Gartel, A. L. (2009). A novel mode of FoxM1 regulation: positive auto-regulatory loop. *Cell Cycle*, *8*(12), 1966-1967.

Jovčevska, I., Kočevar, N., & Komel, R. (2013). Glioma and glioblastoma-how much do we (not) know? (Review). *Molecular and clinical oncology*, *1*(6), 935-941.

Kalin, T. V., Wang, I. C., Ackerson, T. J., Major, M. L., Detrisac, C. J., Kalinichenko, V. V.,... & Costa, R. H. (2006). Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. *Cancer research*, 66 (3), 1712-1720.

Kau, T. R., Schroeder, F., Ramaswamy, S., Wojciechowski, C. L., Zhao, J. J., Roberts, T. M.,... & Silver, P. A. (2003). A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer cell*, 4(6), 463-476.

Kim, I. M., Ackerson, T., Ramakrishna, S., Tretiakova, M., Wang, I. C., Kalin, T. V.,... & Kalinichenko, V. V. (2006). The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer research*, 66(4), 2153-2161.

Kleihues, P., Louis, D. N., Scheithauer, B. W., Rorke, L. B., Reifenberger, G., Burger, P. C., & Cavenee, W. K. (2002). The WHO classification of tumors of the nervous system. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 61 (3), 215-225.

Kobayashi, S., Boggon, T. J., Dayaram, T., Jänne, P. A., Kocher, O., Meyerson, M.,... & Halmos, B. (2005). EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 352(8), 786-792.

Koo, C. Y., Muir, K. W., & Lam, E. W. F. (2012). FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(1), 28-37.

Korver, W., Roose, J., Heinen, K., Weghuis, D. O., de Bruijn, D., van Kessel, A. G., & Clevers, H. (1997). The HumanTRIDENT/HFH-11/FKHL16Gene: Structure, Localization, and Promoter Characterization. *Genomics*, 46(3), 435-442.

Lam, E. W. F., Brosens, J. J., Gomes, A. R., & Koo, C. Y. (2013). Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nature Reviews Cancer*, 13(7), 482-495.

Lentzen, G., Klinck, R., Matassova, N., Aboul-ela, F., & Murchie, A. I. (2003). Structural basis for contrasting activities of ribosome binding thiazole antibiotics. *Chemistry & biology*, 10(8), 769-778.

Li, S. K., Smith, D. K., Leung, W. Y., Cheung, A. M., Lam, E. W., Dimri, G. P., & Yao, K. M. (2008). FoxM1c counteracts oxidative stress-induced senescence and stimulates Bmi-1 expression. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16545-16553.

Li, Y., Zhang, S., & Huang, S. (2012). FoxM1: a potential drug target for glioma. *Future oncology (London, England)*, 8(3), 223.

Liu, M., Dai, B., Kang, S. H., Ban, K., Huang, F. J., Lang, F. F.,... & Huang, S. (2006). FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer research*, 66(7), 3593-3602.

Newlands, E. S., Stevens, M. F. G., Wedge, S. R., Wheelhouse, R. T., & Brock, C. (1997). Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer treatment reviews*, 23(1), 35-61.

Nho, R. S., & Hergert, P. (2014). FoxO3a and disease progression. *World journal of biological chemistry*, 5(3), 346.

Overall, C. M., & Dean, R. A. (2006). Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 25(1), 69-75.

Patras, G., Qiao, G. G., & Solomon, D. H. (1999). On the mechanism of background silver staining during sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 20(10), 2039-2045.

Sangodkar, J., Dhawan, N. S., Melville, H., Singh, V. J., Yuan, E., Rana, H.,... & Narla, G. (2012). Targeting the FOXO1/KLF6 axis regulates EGFR signaling and treatment response. *The Journal of clinical investigation*, 122(7), 2637.

Shi, J., Zhang, L., Shen, A., Zhang, J., Wang, Y., Zhao, Y.,... & Shi, G. (2010). Clinical and biological significance of forkhead class box O 3a expression in glioma: mediation of glioma malignancy by transcriptional regulation of p27kip1. *Journal of neuro-oncology*, 98(1), 57-69.

Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., & Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(1), 9-29.

Smith, R. S. (1874). Clinical Lecture on a Case of Cerebral Tumour: Glioma. *British medical journal*, 1(701), 736.

Surawicz, T. S., Davis, F., Freels, S., Laws Jr, E. R., & Menck, H. R. (1998). Brain tumor survival: results from the National Cancer Data Base. *Journal of neuro-oncology*, 40(2), 151-160.

van den Boom, J., Wolter, M., Kuick, R., Misek, D. E., Youkilis, A. S., Wechsler, D. S., ... & Hanash, S. M. (2003). Characterization of gene expression profiles associated with glioma progression using oligonucleotide-based microarray analysis and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *The American journal of pathology*, 163(3), 1033-1043.

van der HEIDE, L., Hoekman, M., & Smidt, M. (2004). The ins and outs of FoxO shuttling: mechanisms of FoxO translocation and transcriptional regulation. *Biochem. J*, 380, 297-309.

van Kempen, L. C., & Coussens, L. M. (2002). MMP9 potentiates pulmonary metastasis formation. *Cancer cell*, 2(4), 251-252.

Wang, Z., Banerjee, S., Kong, D., Li, Y., & Sarkar, F. H. (2007). Down-regulation of Forkhead Box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Cancer research*, 67(17), 8293-8300.

Ware, M. L., Berger, M. S., & Binder, D. K. (2003). Molecular biology of glioma tumorigenesis.

Yao, K. M., Sha, M., Lu, Z., & Wong, G. G. (1997). Molecular Analysis of a Novel Winged Helix Protein, WIN EXPRESSION PATTERN, DNA BINDING PROPERTY, AND ALTERNATIVE SPLICING WITHIN THE DNA BINDING DOMAIN. *Journal of Biological Chemistry*, 272(32), 19827-19836.

Ye, H., Kelly, T. F., Samadani, U., Lim, L., Rubio, S., Overdier, D. G., ... & Costa, R. H. (1997). Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Molecular and cellular biology*, 17(3), 1626-1641.

Yoshida, Y., Wang, I. C., Yoder, H. M., Davidson, N. O., & Costa, R. H. (2007). The forkhead box M1 transcription factor contributes to the development and growth of mouse colorectal cancer. *Gastroenterology*, 132(4), 1420-1431.

Zhang, Y., Zhang, N., Dai, B., Liu, M., Sawaya, R., Xie, K., & Huang, S. (2008). FoxM1B transcriptionally regulates vascular endothelial growth factor expression and promotes the angiogenesis and growth of glioma cells. *Cancer research*, 68(21), 8733-8742.